

ARTICULO ORIGINAL

TAMIZAJE DE WEDELOLACTONA EN REPRESENTANTES PERUANOS DE ECLIPTINAE Y HELIANTHINAE (HELIANTHEAE, ASTERACEAE) Y MÉTODO PREPARATIVO APLICADO EN *Eclipta prostrata* (L.) L.

SCREENING OF WEDELOLACTONE IN PERUVIAN REPRESENTATIVES OF ECLIPTINAE AND HELIANTHINAE (HELIANTHEAE, ASTERACEAE) AND PREPARATIVE METHOD APPLIED IN *Eclipta prostrata* (L.) L.

Carlos Alberto Serrano Flores^{1*}, Belea Calsino Curie², Jorge Choquenaira Pari³
& Eric F. Rodríguez Rodríguez⁴

¹Departamento de Química. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco, Perú

²Centro de Salud de Dignidad Nacional-Cusco, Perú

³Departamento de Química. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco, Perú

⁴Herbarium Truxillense (HUT), Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú

*casf2050@gmail.com

RESUMEN

Se analiza varias especies de Ecliptinae y Helianthinae (Asteraceae) del Perú en busca de wedelolactona, resultando ausente en todos los casos analizados, excepto en *Eclipta prostrata* (L.) L. una especie invasora común en muchos lugares de altitudes bajas en el Perú. El contenido de este compuesto fenólico en diferentes recolecciones de *Eclipta prostrata* muestra valores que van del 1.2 hasta el 2.7 por ciento. Consiguientemente se ha desarrollado método preparativo para wedelolactona a partir de *Eclipta* que permite obtener un producto de alta pureza pero con bajo porcentaje de recuperación respecto al contenido real.

Palabras Clave: Ecliptinae, *Eclipta prostrata*, wedelolactona, cromatografía.

ABSTRACT

Several species of Ecliptinae and Helianthinae (Asteraceae) from Peru are analyzed in search of wedelolactone, being absent in all the analyzed cases, except in *Eclipta prostrata* (L.) L. a common weed in many low places of Peru. The content of this phenolic compound in different collections of *Eclipta prostrata* shows values ranging from 1.2 to 2.7 percent. Accordingly, a preparative method has been developed for wedelolactone from *Eclipta*, which allows to obtain a high purity product but with a low percentage of recovery from the actual content.

Keywords: Ecliptinae, *Eclipta prostrata*, wedelolactone, chromatography.

Recibido: 20 Mayo 2017.

Aceptado: 21 Agosto 2017.

Publicado online: 30 Diciembre 2017.

INTRODUCCIÓN

Robinson (1981) efectuó una revisión de las 35 subtribus de la tribu Heliantheae perteneciente a la gran familia Asteraceae. De hecho, la especie más conocida de la tribu Heliantheae es el girasol (*Helianthus annuus* L., Helianthinae). En este mismo trabajo, se describe a la sub-tribu Ecliptinae, que incluye dos géneros *Eclipta* y *Wedelia* caracterizados por presentar un coumestano particular, la wedelolactona (Govindachari *et al.*, 1956), (Wagner *et al.*, 1986).

Esta sustancia tiene interesantes aplicaciones farmacológicas: Inhibidor de la 5-lipoxigenasa, antihepatotóxico, anticancerígeno, antiinflamatorio, antibacteriano, antiofidico, antihiperlipidémico, antiosteoporótico, antiviral, entre otras (Rahmatullah *et al.*, 2014).

Estudios previos indican que el descubrimiento de la wedelolactona fué en *Wedelia calendulacea* (L.) Less. (= *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr.) (Govindachari *et al.*, 1956), actualmente aceptada como *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski; de allí es de donde proviene el nombre de la sustancia. Posteriormente, Wagner *et al.* (1986) la encuentra en *Eclipta alba* (L.) Hassk., demostrando que es un agente antihepatotóxico tan potente como las silimarinas de otra Asteraceae (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.).

En el caso de *Eclipta prostrata* (L.) L., nadie reportó su nombre trivial excepto una niña que la llamó "hierba del Amanecer" en Quillabamba, Cusco. Esta especie es de amplia distribución mundial y en Perú se encuentra en casi todas las regiones entre 0 y 1000 m (Brako & Zarucchi, 1993). En India, y Asia en general tiene una medicina tradicional bien descrita.

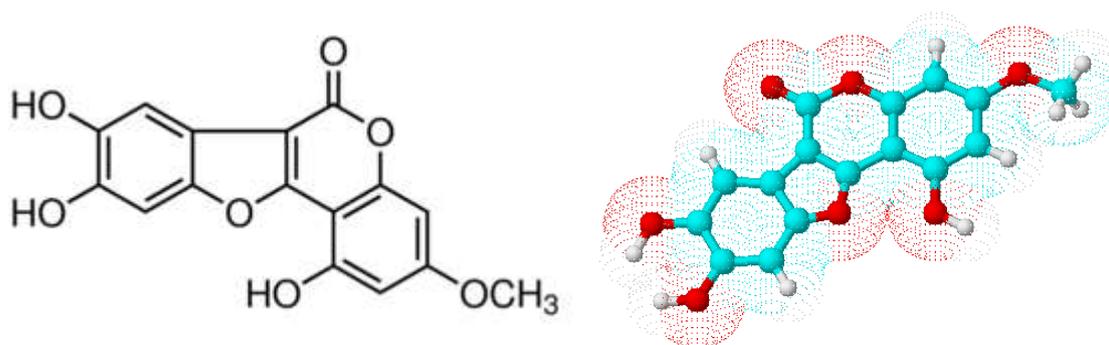


Fig. 1. Estructura de la wedelolactona, pertenece a una categoría de sustancias que se conocen con el nombre de coumestanos.

Como en la zona de Quillabamba, Cusco se ha detectado la presencia de *Eclipta prostrata* (L.) L. y de *Wedelia grandiflora* Benth., consideramos importante evaluar y cuantificar la wedelolactona en estas especies y en otros representantes de Ecliptinae y Helianthinae (Asteraceae) registradas para la flora de Perú (Brako & Zarucchi, 1993; Sagástegui & Leiva, 1993).



Fig. 2. A. *Eclipta prostrata* L. (L.) en Potrero, Quillabamba, Cusco, 1300 m. (Foto: C. Serrano F.).



Fig. 3. *Wedelia grandiflora* Benth. en la localidad Chaullay, Cusco, 1290 m. (Foto: C. Serrano F.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies estudiadas:

1. *Heliopsis buphthalmoides* (Jacq.) Dunal (Ecliptinae, Heliantheae, Asteraceae).
Perú: Región Cusco. Provincia Cusco, distrito Cusco, Larapa, 3465 m, 15 febrero 2014, C. Serrano F. s.n. (HUT-59180).
2. *Viguiera lanceolata* Britton (= *Viguiera mandonii* Sch. Bip. ex Rusby) (Helianthinae, Heliantheae, Asteraceae).
Perú: Región Arequipa. Prov. Caylloma, dsitrito Huambo, Huambo, 3295m, 5 febrero 2015, C. Serrano F. s.n. (HUT-59181).
3. *Encelia canescens* Lam. (Ecliptinae, Heliantheae, Asteraceae).
Región Arequipa. Prov. Arequipa, distrito Yura, Yura, 2595 m, 5 febrero 2015, C. Serano F. s.n. (HUT-59179).
4. *Eclipta prostrata* L. (L.) (Ecliptinae, Heliantheae, Asteraceae).
Perú: Región Cusco. Prov. La Convencion, Quillabamba, Potrero, 1300 m, 24 febrero 2015, C. Serrano F. s.n. (HUT-59178). Prov. La Convención, Quillabamba, Pasñapacana, 1300-1545 m, 25 febrero 2015, C. Serrano F. s.n. (HUT-59183). Región Madre de Dios, Prov. Manu, Salvación, 550 m, 04 marzo 2015, C. Serrano F. s.n. (HUT-59184).
5. *Wedelia grandiflora* Benth. (Ecliptinae, Heliantheae, Asteraceae).
Perú: Región Cusco. Prov. La Convencion, Chaullay, Cusco 1290 m, 18 febrero 2016, C. Serrano F. s.n. (HUT-59189).
6. *Wedelia latifolia* DC. (Ecliptinae, Heliantheae, Asteraceae).
Perú: Región La Libertad. Prov. Otuzco, distrito Otuzco, ruta Trujillo a Otuzco, caserío Ccasmiche, 2010 m, 7 febrero 2016, E. Rodríguez R., C. Serrano F. & S. Miranda 4079 (HUT-59185).
7. *Wedelia helianthoides* Kunth (Ecliptinae, Heliantheae, Asteraceae).
Perú: Región La Libertad. Prov. Otuzco, distrito Otuzco, alrededores de la ciudad de Otuzco, 2650 m, 8 febrero 2016, E. Rodríguez R., C. Serrano F. & S. Miranda 4082 (HUT-59188).
8. *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski (= *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc.) (Ecliptinae, Heliantheae, Asteraceae).
Perú: Prov. Lima, distrito Miraflores, Costa Verde, 200 m, 18 febrero 2017, C. Serrano F. s.n. (HUT-59182).

Análisis hplc de wedelolactona en Ecliptinae peruanas:

El procedimiento de análisis fue el siguiente: Aproximadamente 2 g de material seco, molido y tamizado a malla 50 se extracta con 25 mL de EtOH x 5 minutos al ultrasonido x 6 veces. Los filtrados se reúnen y se evaporan sequedad. El extracto seco se trata con EtOH del 70% y se filtran a través de un cartucho HyperSep C₁₈ de 1 g, según:

Pasar por el cartucho 5 mL de EtOH 96%

Pasar por el cartucho 5 mL de EtOH 70%

Pasar extracto de planta disuelto en EtOH 70%

Pasar EtOH del 70% hasta coleccionar exactamente 25 mL de solución.

La solución obtenida se analiza por hplc según (Wang *et al.*, 2014):

Columna Phenomenex RPC₁₈ de 250 x 4.6 mm x 5 µm; tiempo de análisis: 25 minutos; temperatura 30°C, flujo: 1 mL/minuto; detección: 350 y 254 nm.

Gradiente: a) H₂CO₂ al 0.1 % en agua b) MeCN

MINUTOS	% b)
0	33
5	33
17	100
21	100
25	33

Estándar de wedelolactona: 0.5 mg/mL en EtOH del 70% (Ding H. *et al.*, 2015).

Volúmenes de inyección: Variable.

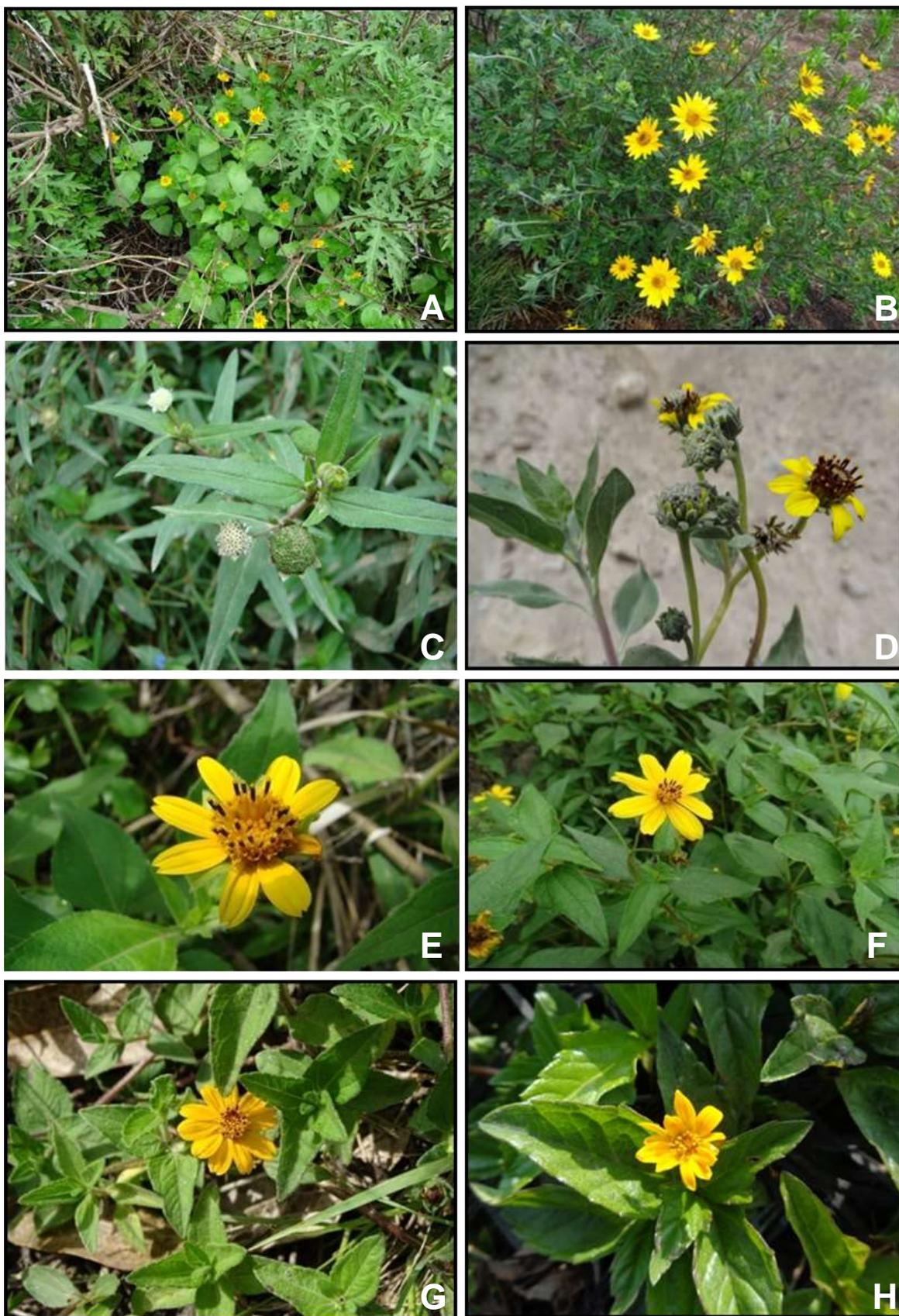


Fig. 3. Hábitos de: A. *Heliopsis bupthalmoides*; B. *Viguiera lanceolata*; C. *Eclipta prostrata*; D. *Encelia canescens*; E. *Wedelia grandiflora*; F. *Wedelia latifolia*; G. *Wedelia helianthoides*; H. *Sphagneticola trilobata* (cultivada). (Fotos: C. Serrano F.).

Método preparativo para wedelolactona a partir de *Eclipta prostrata*:

El 12-XI-2016 se colectó *E. prostrata* en el sector de Pasñapacana (1300-1545 m), en Quillabamba.

El análisis hplc de esta muestra arroja un 1.36% de wedelolactona (Wang *et al.*, 2015) (ver cromatograma en la figura 6).

Entonces, 63.175g de material molido y tamizado a malla 50 se extrae en Soxhlet con EtOH del 96%. El extracto se evapora a sequedad y el extracto seco se trata con 450 mL de agua hirviente.

El extracto acuoso filtrado se extrae con 50 mL de acetato de etilo x 6 veces. Desección con MgSO₄ y evaporación a sequedad para dar 1.4733 g de extracto y la fase acuosa se reserva para luego extraerla con butanol.

Luego se acondiciona en EtOH 96% una columna de silicagel RPC₁₈ de 40-63 µm de 5 cm de altura x 2.5 cm de diámetro. Luego se atraviesa a través de ella EtOH del 70% para luego impregnar todo el extracto de AcOEt disuelto en EtOH del 70%. La columna entonces se eluye con 300 mL más de EtOH 70%.

El eluato hidroalcohólico así obtenido se evapora hasta 50 mL y esta suspensión acuosa así obtenida se extrae con 25 mL de AcOEt x 4 veces. Desección con MgSO₄ y evaporación a sequedad producen 342.6 mg de extracto: **Extracto A**.

El marco acuoso del primer reparto con AcOEt se extrae con 200 mL de BuOH en tres porciones. La evaporación a sequedad de la fase butanólica produce 784.3 mg de extracto: **Extracto B**.

Los 342.6 mg de **extracto A** se impregnan en SiGel de 40-63 µm y se aplican sobre una columna de SiGel Snap Ultra (Biotage) de 25 g (30 x 72 mm; column volume = 45 mL) acondicionada con 3% de EtOH en CHCl₃ y se desarrolla en gradiente hasta 100% de EtOH a un flujo de 75 mL/minuto. La detección se hace a 350 y 254 nm y la colección a 350 nm en un cromatografo Flash Isolera I de Biotage, el tamaño de cada fracción es de 15 mL.

Así:

Fracción 25-29: 149.6 mg

Fracción: 30-33: 35.4 mg.

En la figura 7 se observa el cromatograma preparativo del **extracto A**.

Los 149.6 mg de la fracción 25-29 se tratan con 7 mL de MeOH y por abandono producen 24.8 mg de wedelolactona (**wA**). El tratamiento de los 35.4 mg de la fracción 30-33 producen 2.7 mg adicionales de wedelolactona (**wB**).

Los 784.3 mg del extracto butanólico (**extracto B**) se tratan con 5 mL de AcOEt:EtOH (1:1) x 3 veces. Filtrar. Evaporar a sequedad. Se obtienen 727.7 mg de extracto.

Este último extracto se impregna en SiGel de 40-63 µm. y se aplica en una columna Biotage KPSil Snap de 50 g (39 x 81 mm; CV = 66 mL) acondicionada con 3% de EtOH en CHCl₃. Se desarrolla en gradiente hasta 100 % de EtOH con equipo, detección y tamaño de fracción igual al caso anterior pero a un flujo de 60 mL/minuto.

Se juntaron las fracciones 3-9 y por tratamiento con MeOH se obtienen secuencialmente 16.2 mg de **wC** y 5.1 mg de **wD**.

El análisis hplc según (Wang *et al.*, 2015) muestra para **wA** (100% de pureza), **wB** (94.33%), **wC** (100%) y **wD** (90.73%) (ver figura 5.- para el caso **wA**). Condiciones hplc: Tiempo de

análisis 60 minutos; temperatura: 30°C; flujo 1 mL/minuto; dad: 350 y 254 nm. Gradiente: a) H₂CO₂ al 0.1% y b) MeCN, según:

tiempo	% b)
0	10
30	25
35	30
45	50
50	100
55	10
60	10

En la figura 5 se muestra cromatograma y espectro ultravioleta de la wedelolactona **wA**.

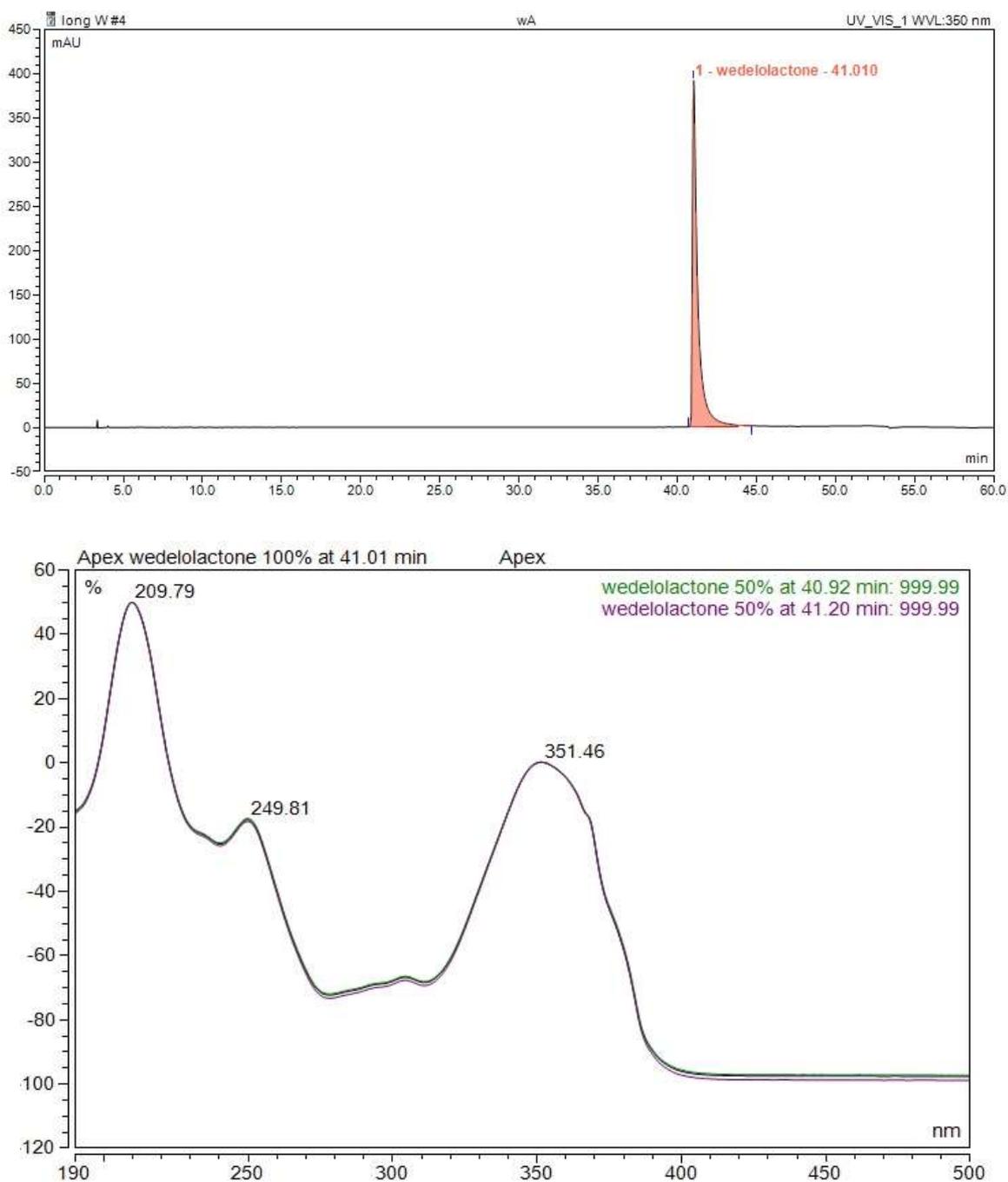


Fig. 5. Cromatograma y espectro UV de la wedelolactona **wA**.

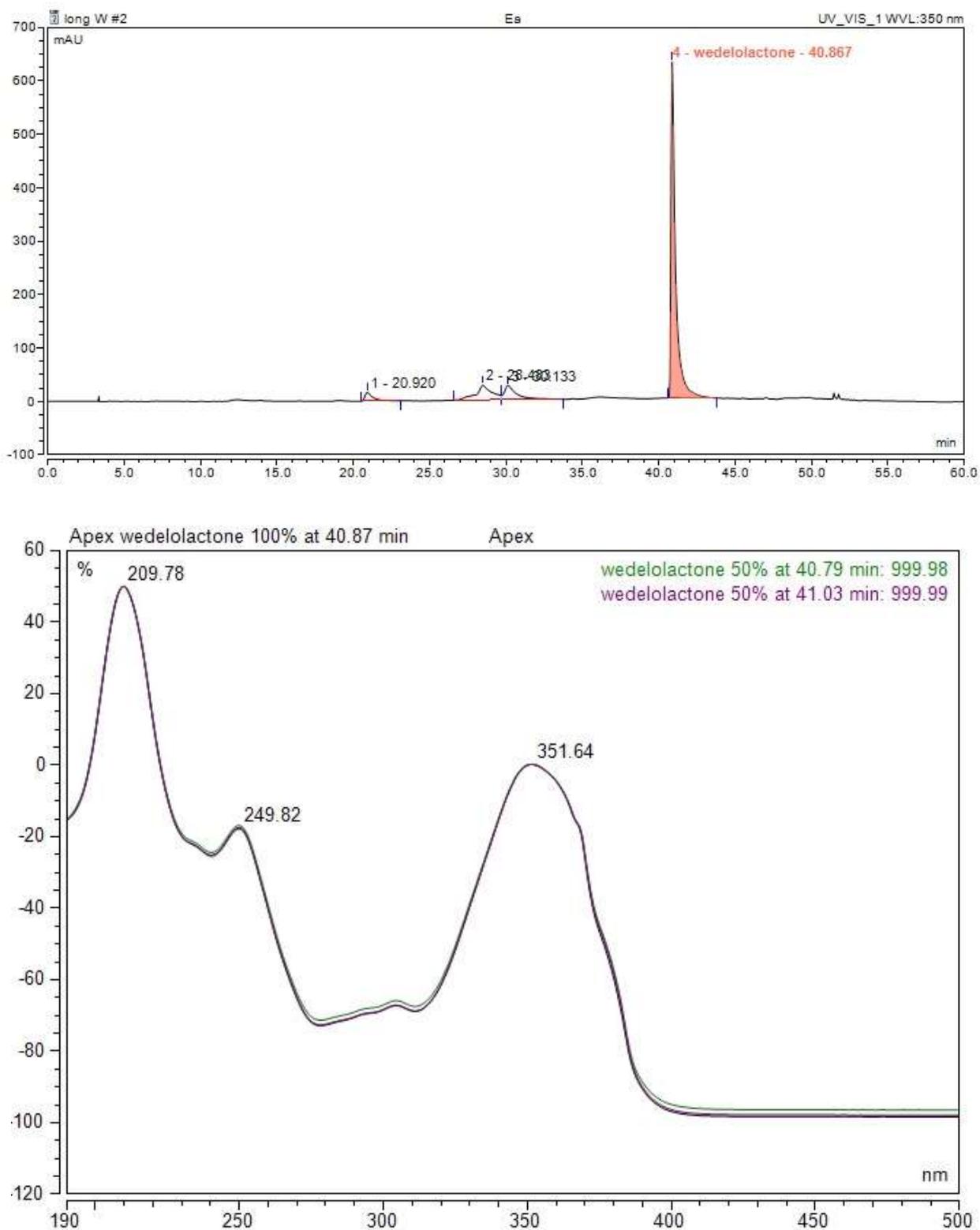


Fig. 6. Cromatograma de extracto total de *Eclipta prostrata* (superior) y espectro correspondiente a wedelolactona (inferior).

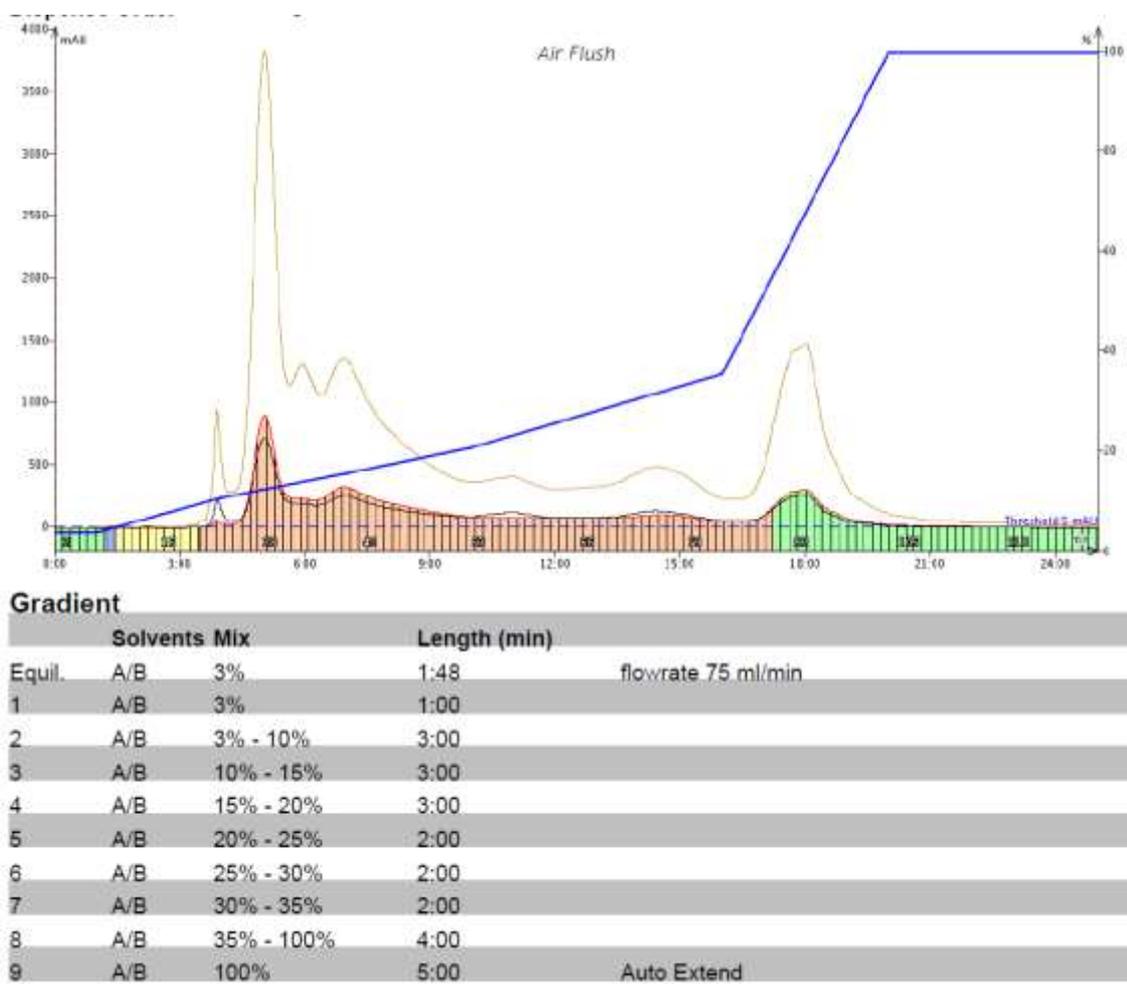


Fig. 7. Cromatograma preparativo del extracto A. Notar gradiente utilizado. La wedelolactona eluye en las fracciones 25-33, es decir con aproximadamente 15 % de etanol en cloroformo.

RESULTADOS

Para el tamizaje de Wedelolactona:

Cuadro 1. Presencia de % Wedelolactona según las especies y localidades.

Especie	Localidad	% Wedelolactona
<i>Eclipta prostrata</i>	Pasñapacana, Quillabamba, 1300-1545 m	2.30
<i>Wedelia grandiflora</i>	Chaully, Quillabamba, Cusco, 1290 m	---
<i>Heliopsis buphthalmoides</i>	Larapa, Cusco, 3465 m	---
<i>Viguiera lanceolata</i>	Huambo, Arequipa, 3295 m	---
<i>Encelia canescens</i>	Yura, Arequipa, 2595 m	---
<i>Wedelia latifolia</i>	Carretera Otuzco, La Libertad 2010 m	---
<i>Wedelia helianthoides</i>	Otuzco, La Libertad, 2650 m	---
<i>Wedelia trilobata</i>	Costa Verde, Lima, 250 m	---
<i>Eclipta prostrata</i>	Potrero, Quillabamba, Cusco, 1300 m	1.22
<i>Eclipta prostrata</i>	Salvación, Manu, Madre de Dios, 553 m	2.65

En el cuadro 1 se puede evidenciar que la única especie que contiene wedelolactona es *Eclipta prostrata*.

Para la preparación de wedelolactona a partir de *Eclipta prostrata*:

Se obtuvo 0.026% de wedelolactona a partir de *Eclipta prostrata* colectada en Pasñapacana-Quillabamba, Cusco. La caracterización de esta sustancia hizo cromatográficamente: hptlc (Thapliyay *et al.*, 2001) y hplc (Wang *et al.*, 2015) y también por espectroscopía ultravioleta (Wagner *et al.*, 1986) e infrarroja (CCRAS, 2009).

En la figura 8 se muestra cromatograma hptlc de wedelolactona y el correspondiente espectro infrarrojo.

Como la especie *Eclipta prostrata* utilizada (Pasñapacana, La Convención, Cusco) contiene 1.36% de wedelolactona y preparativamente se obtiene un rendimiento del 0.077%, implica un porcentaje de recuperación del 5.66 respecto al contenido real.

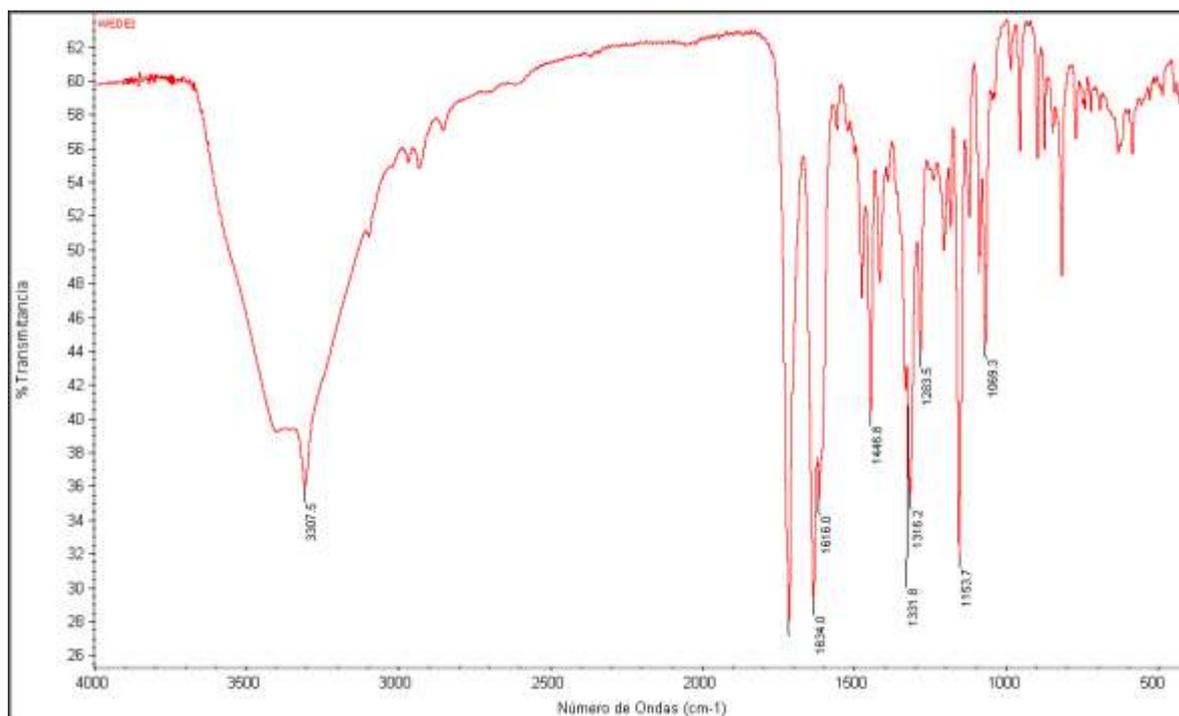
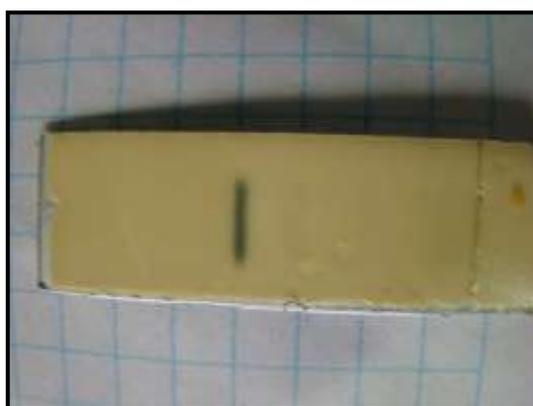


Fig. 8. Arriba cromatograma de wedelolactona en capa fina de SiGelG60 con AcOEt:MeOH:H₂O:H₂CO₂ ((9:0.5:0.5:0.2) y revelado con FeCl₃ al 5% (Thapliyay *et al.*, 2011), así la wedelolactona tiene un R_f = 0.72. Abajo espectro IR tomado en KBr.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De todas las especies analizadas (7 Ecliptinae, 1 Helianthinae), solo se ha encontrado wedelolactona en *Eclipta prostrata* en un rango de concentración que va del 1.22 al 2.65%. Ninguna especie de *Wedelia* de la flora peruana contiene esta sustancia. A diferencia del reporte de 0.084% de wedelolactona en *Sphagneticola trilobata* (= *Wedelia trilobata*) (Sureshkumar *et al.*, 2011), la misma especie cultivada en la "Costa Verde" (Lima) también es negativa. Hay que notar entonces, que a nivel mundial la wedelolactona está presente solo en *Eclipta prostrata* (= *Eclipta alba*), *Sphagneticola calendulacea* (= *Wedelia calendulacea*) y en *Coldenia procumbens* (Boraginaceae) (Beena *et al.*, 2011).

El método preparativo para wedelolactona aplicado en *Eclipta prostrata* se basa en (Ding *et al.*, 2015), (Wagner *et al.*, 1986), (Mors *et al.*, 1989), (Phitayanukul *et al.*, 2004, 2007), (Jian *et al.*, 2012) y (Pandey *et al.*, 2012) y aunque reportamos baja recuperación de la sustancia, tiene pureza suficiente para utilizarla como estándar cromatográfico. Además, está claro que el sistema cromatográfico preparativo que reportamos (gradiente cloroformo-etanol) debe de cambiarse por uno ambientalmente más amigable (Taygerly *et al.*, 2012). Se concluye que el taxón *Eclipta prostrata* colectado en Perú es buena materia prima para wedelolactona.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

CASF: contribuyó a la ejecución del trabajo e investigaciones de laboratorio, recolección de parte del material botánico y redactó el documento; BCC y JCP: han contribuido en la recolección de muestras de plantas y revisado el documento; y EFRR: ha colectado algunas especies, identificado todas las especies y revisado el documento. Todos los autores han leído el manuscrito final y han aprobado la presentación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beena, P.; S. Purnima & R. Kokilavani. 2011. Identification and estimation of wedelolactone in *Coldenia procumbens* Linn. *Der Pharmacia Lettre* 3(4): 320-324.
- Brako, L. & J. Zarucchi. 1993. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Garden*. 45.
- CCRAS. 2009. Marker Compounds of selected Ayurvedic Drugs. WHO New Delhi.
- Ding, H.; C. Liu; G. Tang; R. Chen & M. Liu. 2015. Determination of the solubility and thermodynamic properties of wedelolactone in a binary solvent of ethanol and water. *Fluid Phase Equilibria* 385, 139-146 .
- Govindachari, T.; K. Nakarajan & P. Pai. 1956. Chemical examination of *Wedelia calendulacea*. I. Structure of wedelolactone. *J. Chemical Society* 629.
- Jiang, J.; Q. Liu; H. Zhao & X. Zhong. 2012. *Eclipta prostrata* L. phytochemicals: Isolation, structure elucidation, and their antitumor activity. *Food and Chemical Toxicology* 50, 4016-4022.
- Moninckx, J. 2017. *Eclipta prostrata* L. (L.). Moninckx Atlas, vol. 8 t. 20 (1682-1709). Disponible en: www.plantillustrations.org. Revisado: 20 marzo 2017.
- Mors, W.; M. do Nascimento; J. Parente; M. da Silva; P. Melo & G. Suarez-Kurtz. 1989. Neutralization of lethal and myotoxic activities of southamerican rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). *Toxicon* 27, 1003-1009.

- Pandey, V.; D. Manvar; M. Mishra & S. Kumar.** 2012. Identification and evaluation of antihepatitis C virus phytochemicals from *Eclipta alba*. *J. Ethnopharmacology* 144:545-554.
- Phitayanukul, P.; S. Laovachirasuwan; R. Babovada; N. Pakmanee & R. Suttisri.** 2004. Anti-venom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom. *J. Ethnopharmacology* 90: 347-352.
- Phitayanukul, P.; B. Lapett; R. Babovada; N. Pakmanee & R. Suttisri.** 2007. Inhibition of proteolytic and hemorrhagic activities by ethyl acetate extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom. *Pharmaceutical Biology* 45(4): 282-288.
- Rahmatullah, M.; R. Jahan; A. Al-Nahain; S. Majumder & M. Rahmatullah.** 2014. Ethnopharmacological significance of *Eclipta alba*. *International Scholarly Research Notices*.
- Robinson, H.** 1981. A revision of the tribal and subtribal limits of the Heliantheae (Asteraceae). *Smithsonian Contributions to Botany* 51: 1-102.
- Sagástegui A. & S. Leiva.** 1993. "Flora invasora de los cultivos del Perú".- CONCYTEC.
- Sureshkumar, S.; M. Krishnamurthi; R. Venugopalan & S. Thenmozhi.** 2011. Estimation of wedelolactone content in *Wedelia* species by HPTLC technique. *J. of Pharmacy research* 4(1): 193-194.
- Taygerly, J.; L. Miller; A. Yee & E. Peterson.** 2012. A convenient guide to help replacement solvents for dichloromethane in chromatography. *Green Chemistry* 14, 3020-3025.
- Thapliya, S.; N. Mahadevan & M. Nanjan.** 2011. Analysis of wedelolactone in *Eclipta alba* and its formulation by HPTLC. *J. of Global Trends in Pharmaceutical Sciences* 2(4): 450-457.
- Wagner, H.; B. Geyer; Y. Kiso; H. Hikino & G. Rao.** 1986. Coumestans as the main active principles of the liver drugs *Eclipta alba* and *Wedelia calendulacea*. *Planta Medica* 370-374.
- Wang, J., X. Fang, Y. Wang, X. Li X.; H. Zhou & L. Zhu.** 2014. Optimization of ultrasonic assisted extraction of wedelolactone and antioxidant polyphenols from *Eclipta prostrata* L. using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 138: 55-64.
- Wang, J.; X. Fang; J. Hao; X. Li & N. Guo.** 2015. Simultaneous extraction, identification and quantification of phenolic compounds in *Eclipta prostrata* using microwave-assisted extraction combined with HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Chemistry* 188: 527-536.

ANEXO 1



***Eclipta prostrata* (L.) L. sensu Moninckx (2017).**